

# Localisation de l'acide gamma linolénique dans les mycéliums et dans les spores chez deux mucorales

A. AGGELIS (1), M. PINA (2) et J. GRAILLE (2)

**Résumé.** — En vue d'expliquer le rôle que pourrait jouer l'acide gamma linolénique dans la croissance des microorganismes, la localisation de cet acide est étudiée chez deux souches de *Mucor* au niveau des lipides membranaires d'une part, et au niveau des lipides de réserves des mycéliums et des spores d'autre part. Les compositions en acides gras de ces différents constituants sont comparées et une hypothèse sur la migration des lipides de réserves est avancée pour comprendre le fonctionnement de la croissance des mycéliums.

## INTRODUCTION

L'acide gamma linolénique (C18 : 3, n-6), acide de plus en plus fréquemment utilisé en pharmacie et dans l'industrie des cosmétiques, est un acide gras essentiel de la série n-6, obtenu par désaturation de l'acide linoléique. Cette désaturation est une étape indispensable chez l'homme [1].

Sa production provient essentiellement d'huiles dites gamma linoléniques extraites des graines des plantes des familles *Oenotheraceae* [2, 3] et *Boraginaceae* [4]. Toutefois, les champignons Phycomycètes sont réputés pour contenir dans leurs triglycérides des quantités importantes de cet acide [5, 6]. C'est ainsi que depuis 1985 une production des huiles gamma linoléniques à l'échelle industrielle a été envisagée à partir de ces champignons [7]. Les études récentes que nous avons menées ont montré que les champignons de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et *Mucor rouxianus* CBS 120-08 sont parmi les souches les plus performantes quant à la production de cet acide [8, 9].

Dans le but d'essayer d'expliquer le rôle physiologique de l'acide gamma linolénique, nous avons analysé les lipides membranaires et les lipides de réserve des mycéliums et des spores de ces deux champignons. Après avoir cultivé les souches sur un milieu favorisant la production des spores, les biomasses ont été récoltées et les mycéliums ont été séparés des spores. Les lipides polaires et non polaires extraits sélectivement dans ces différentes parties de la biomasse ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — Matériel biologique.

Les souches utilisées proviennent du Centraal Bureau voor Schimmel-cultures de Baarn, (CBS) et sont :

*Mucor circinelloides* CBS 172-27

et *Mucor rouxianus* CBS 120-08.

Les deux souches sont conservées à 4 °C sur milieu DPA-Difco (Potato Dextrose Agar).

### 2. — Conditions de culture.

La culture des champignons a été effectuée dans des boîtes de Pétri contenant 24 ml de milieu PDB-Difco (Potato

Dextrose Broth à 24 g/l) et à une température de 28 °C. Le milieu PDB, choisi pour cette étude, favorise la production des spores [10]. Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

### 3. — Récolte de la biomasse et séparation des spores.

Après 8 jours d'incubation, la biomasse constituée des spores et du mycélium est transférée dans un erlenmeyer d'un litre contenant 300 ml d'eau distillée. Les spores sont libérées par vibration puis séparées du mycélium par filtration différentielle (filtres 50 µm et 0,2 µm). La pureté de chacune des fractions de la biomasse est vérifiée par observation microscopique.

Les spores et le mycélium sont alors congelés, puis lyophilisés jusqu'à poids constant ; l'extraction des lipides est effectuée sur les spores et le mycélium ainsi obtenus.

### 4. — Techniques analytiques.

#### • Extraction des lipides neutres.

Réalisées dans un appareil de Soxhlet, les extractions s'effectuent au reflux de l'hexane pendant 7 heures. Le mélange hexane-huile est recueilli, puis le solvant est éliminé par évaporation rotative sous pression réduite d'azote afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Les lipides ainsi extraits sont essentiellement des triglycérides qui constituent les lipides de réserve des champignons.

#### • Extraction des lipides polaires.

L'extraction des lipides membranaires s'effectue de la même façon après l'extraction des lipides neutres sur la biomasse séchée à l'étuve (t = 50 °C) jusqu'à poids constant. Cette deuxième extraction est réalisée avec un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) pendant 7 heures, ce qui permet d'extraire les lipides complexes des membranes cellulaires.

#### • Composition en acides gras des lipides extraits.

Les acides gras des différents extraits lipidiques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après transformation en esters méthyliques [11].

#### — Conditions chromatographiques

Un micro litre de solution d'esters méthyliques à 1 % dans l'hexane est injecté dans un appareil Carlo Erba 4160 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et relié à un intégrateur Delsi Enica 10. La séparation des constituants s'effectue

(1) Laboratoire des Industries Agroalimentaires, Université Agronomique d'Athènes, 75, Iéra Odos-Votanicos, Athènes (Grèce)

(2) Division Chimie des Corps Gras, IRHO/CIRAD BP 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

à l'aide d'une colonne capillaire de silice fondue DB Wax 30W (J et W) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,3 mm.

Épaisseur du film : 0,25 µm.

— Conditions expérimentales.

Température : injecteur = 250 °C ; détecteur = 275 °C ; four = 190 °C.

Gaz vecteur : hélium ; débit = 3 ml/min ; rapport de division : 1/50.

L'identification des esters méthyliques a été effectuée sur la base des longueurs de chaînes équivalentes à celles des esters méthyliques d'acides gras standards.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les compositions en acides gras des lipides de réserve et des lipides membranaires des deux souches de *Mucor* étudiées sont consignées dans les tableaux I et II. On remarquera dans tous les cas la prépondérance des acides gras palmitique et oléique alors que l'on ne trouve les acides gras courts ( $C \leq 12$ ) ou longs ( $C \geq 20$ ) qu'en faibles quantités.

Le tableau I donne la composition des lipides de *Mucor circinelloides* CBS 127-27. Nous pouvons remarquer que la composition des lipides de réserve du mycélium et des spores est similaire à celle des lipides membranaires du mycélium dans les trois cas : l'acide oléique (C18 : 1) est l'acide prépondérant et la proportion de l'acide palmitique (C16 : 0) est de l'ordre de 20 %. Les acides gamma linoléique et linoléique ont tous deux une concentration voisine de 10 %.

TABLEAU I. — Composition centésimale en acides gras des lipides de *Mucor circinelloides* CBS 172-27

	Localisation des lipides			
	Lipides de réserves		Lipides membranaires	
	du mycélium	des spores	du mycélium	des spores
Acides gras				
12 : 0	0,4	0,3	0,3	0,6
14 : 0	3,2	1,6	3,2	2,0
16 : 0	19,6	20,9	19,2	24,7
16 : 1	4,4	3,3	4,6	4,1
18 : 0	4,4	5,0	4,4	6,9
18 : 1	42,3	38,8	40,5	30,7
18 : 2	10,0	10,6	10,0	8,7
18 : 3 (n-6)	10,1	9,9	10,9	6,7
18 : 3 (n-3)	—	—	0,1	—
20 : 0	0,3	1,5	0,1	1,4
20 : 1	0,6	0,8	0,4	—
22 : 0	0,4	1,0	0,4	1,8
22 : 1	—	—	0,1	—
24 : 0	1,4	0,7	1,2	1,4
24 : 1	0,2	—	1,5	—
Autres	2,7	5,6	3,1	11,0

Dans les lipides membranaires des spores, on constate par contre des différences par rapport aux cas précédents et notamment la concentration plus faible de l'acide oléique et

celle plus importante de l'acide palmitique. Les acides linoléique et gamma linoléique ont quant à eux, dans ces lipides, une concentration en diminution, par rapport à celle trouvée dans les lipides de réserve et les membranes mycéliennes.

On peut globalement formuler les mêmes remarques en ce qui concerne la souche de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 (tabl. II). c'est-à-dire que l'on retrouve une composition en acides gras des lipides membranaires du mycélium qui s'apparente à celle trouvée dans les lipides de réserve, ces derniers provenant indifféremment des mycéliums ou des spores. C'est ainsi que l'on constate également, pour ces 3 compositions en acides gras, une prépondérance des acides oléique et palmitique et une concentration voisine, de l'ordre de 10 %, des acides linoléique et gamma linoléique.

TABLEAU II. — Composition centésimale en acides gras des lipides de *Mucor rouxianus* CBS 120-08

	Localisation des lipides			
	Lipides de réserves		Lipides membranaires	
	du mycélium	des spores	du mycélium	des spores
Acides gras				
12 : 0	1,3	0,8	1,8	1,1
14 : 0	3,0	2,2	3,9	4,3
16 : 0	22,3	21,9	21,1	30,1
16 : 1	4,5	3,5	4,7	5,5
18 : 0	4,1	5,7	6,2	14,9
18 : 1	37,5	33,0	37,1	11,6
18 : 2	10,4	9,7	9,5	4,3
18 : 3 (n-6)	11,3	9,5	11,1	2,1
18 : 3 (n-3)	—	—	0,1	0,5
20 : 0	0,4	0,4	0,3	1,5
20 : 1	0,6	0,4	0,3	0,6
22 : 0	0,4	1,0	0,4	1,9
22 : 1	—	0,3	—	1,8
24 : 0	0,5	3,3	0,3	2,2
24 : 1	—	—	0,2	0,5
Autres	3,7	7,7	3,0	17,1

Comme pour l'autre souche, seuls les lipides membranaires des spores se différencient avec une nette diminution de l'acide oléique et une augmentation appréciable de l'acide palmitique qui devient l'acide gras majoritaire.

Il faut noter aussi une concentration plus importante de l'acide stéarique chez *Mucor rouxianus*. Enfin, la diminution de la concentration des acides polyinsaturés est plus sensible que pour l'autre souche, surtout en ce qui concerne l'acide gamma linoléique.

En raisonnant sur le rapport  $\Sigma S/\Sigma I$  (somme de AG saturés sur somme des AG insaturés) qui rend compte de la perméabilité relative des membranes donc de leur plasticité ou de leur rigidité, on constate que pour les 2 souches, ce sont les lipides membranaires des spores qui sont les moins insaturés et que ce rapport est du même ordre de grandeur pour les lipides des autres constituants, encore que dans le cas des lipides de réserves des spores, on note pour les 2 souches une

TABLEAU III. — Répartition des acides gras saturés (S %) et insaturés (I %) dans les lipides de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 ; variations du rapport S/I et concentration de l'acide gamma linoléique dans les lipides des deux champignons

Localisation des lipides		$\Sigma S$ %	$\Sigma I$ %	$\Sigma S/\Sigma I$	C18 : 3 (n-6) %
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 172-27					
Lipides de réserves	mycélium	29,8	67,6	0,44	10,1
	spores	31,0	63,4	0,49	9,9
Lipides membranaires	mycélium	28,9	68,1	0,42	10,9
	spores	38,8	50,2	0,77	6,7
<i>Mucor rouxianus</i> CBS 120-08					
Lipides de réserves	mycélium	33,1	64,3	0,51	11,3
	spores	35,3	57,0	0,62	9,5
Lipides membranaires	mycélium	34,4	63,0	0,55	11,1
	spores	56,0	26,9	2,08	2,1

légère augmentation de la saturation par rapport aux constituants mycéliens (tabl. III). De plus, on remarque que, pour un constituant donné, les lipides de *Mucor rouxianus* sont systématiquement plus saturés que ceux de *Mucor circinelloides*.

Quand on essaie d'établir une relation entre la valeur de ce rapport et la localisation de l'acide gamma linoléique, on constate que la richesse des constituants cellulaires en cet acide varie dans des proportions inverses de ce rapport. Ainsi, dans le cas le plus net, c'est-à-dire dans celui des membranes des spores, le rapport  $\Sigma S/\Sigma I$  de 2,08 correspond à un taux d'acide gamma linoléique de 2,1 % seulement.

Ce résultat n'est d'ailleurs par étonnant en soi, dans la mesure où les spores, étant le plus rigide des champignons, ont besoin de membranes mieux structurées afin de résister au stress osmotique, ce qui nécessite une augmentation de la saturation des acides gras par rapport à celle des membranes mycéliennes.

Le fait que les acides gras des lipides de réserves des mycéliums et des spores soient comparables entre eux, mais également très proches de ceux des membranes des mycéliums (Fig. 1), suggère une hypothèse selon laquelle un mécanisme de migration des lipides de réserve assurerait le bon fonctionnement de la croissance du microorganisme

d'une part par le prolongement des mycéliums déjà existants, et d'autre part par la formation de nouvelles hyphes (Fig. 2) à partir des spores.

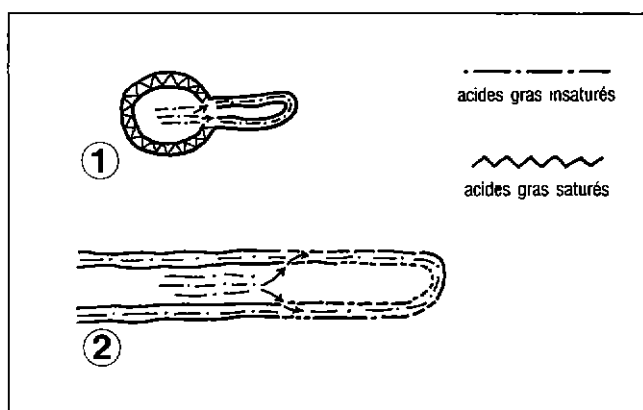


FIG. 2. — Hypothèse migrations des lipides de réserves des spores et des mycéliums en vue de la formation d'hyphes nouvelles.  
1 = cas de spores  
2 = cas de mycélium.

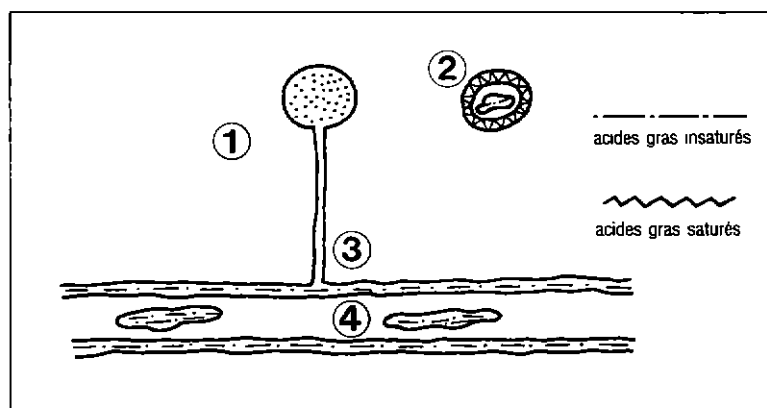


FIG. 1. — Localisation des acides gras saturés et insaturés des lipides membranaires et des lipides de réserves des deux *Mucor*

- 1 = sporangium
- 2 = spore
- 3 = mycélium
- 4 = réserves lipidiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRENNER R. R. (1981). — Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prof. Lipid. Res.*, **20**, 41-46.
- [2] PACCALIN J., DABADIE H., BERNARD M., MENDY F., SPIELMANN D. et DELHAYE N. (1984). — Intérêt d'une nouvelle plante oléagineuse : l'ONAGRE. Apport en acide gamma linoléique et troubles de la desaturation en pathologie. *Med. et Nut.* **XXI**, **2**, 132-136.
- [3] PINA M., GRAILLE J., GRIGNAC P., LACOMBE A., QUENOT P. et GARNIER P. (1984). — Recherche d'Énothères riches en acide gamma linoléique. *Oléagineux*, **39**, 593-596.
- [4] UZZAN A. (1986). — L'huile de bourrache : une huile pleine d'avenir. *Rev. Fr. Corps Gras*, **33**, 385-389.
- [5] SHAW R. (1965). — The occurrence of gamma linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 230-277.
- [6] SHAW R. (1966). — The fatty acids of phycomycetes fungi and the significance of the gamma linolenic acid component. *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**, 325-331.
- [7] HERBERT R. A. et KELTH S. M. (1985). — Microbiological production of gamma linolenic acid. European Patent Application. publ. nr 01 53134.
- [8] AGGELIS G., PINA M., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GRAILLE J., GALZY P., MARTIN-PRIVAT P. et PERRAUD J. P. (1987). — Production d'huiles riches en acide gamma linoléique par diverses souches de phycomycètes. *Oléagineux*, **42**, 379-386.
- [9] AGGELIS G., RATOMAHANINA R., ARNAUD A., GALZY P., MARTIN-PRIVAT P., PERRAUD J. P., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de *Mucor*. *Oléagineux*, **43**, 311-317.
- [10] AGGELIS G. (1989). — Etude de la production d'acide gamma linoléique par des phycomycètes (mucorales). Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de Montpellier II-USTL.
- [11] AFNOR. (1984). — Recueil de Normes Françaises des Corps Gras — graines oléagineuses et produits dérivés, 3<sup>e</sup> éd. NF T. **95**, 60-233.

## SUMMARY

**Gamma linoleic acid location in mycelia and the spores of two Mucorales**

A. AGGELIS, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 5, p. 229-232.

With a view to explaining the role played by gamma linoleic acid in micro-organism growth, the location of this acid in two *Mucor* strains. In both the membrane lipids and the lipids stores in the *mycelia* and the spores, is studied. The fatty acid compositions of these various components are compared and a hypothesis proposed on stored lipid migration, to explain the *mycelium* growth process.

## RESUMEN

**Localización del ácido gamma linoléico en los micelios y las esporas en dos mucorales.**

A. AGGELIS, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 5, p. 229-232.

A fin de explicar el papel que el ácido gamma linoléico podría desempeñar en el crecimiento de los microorganismos, se estudia la localización de este ácido en dos cepas de *mucor* en los lípidos de membranas, por una parte, y en los lípidos de reservas de micelios y esporas, por otra parte. Las composiciones de ácidos grasos de estos diversos constituyentes se comparan, y se emite una hipótesis sobre la migración de los lípidos de reservas para comprender el funcionamiento del crecimiento de los micelios.